

# Caracterización fisicoquímica de los complejos de hidroxietil- $\beta$ -ciclodextrina y $\beta$ -ciclodextrina de rifampicina

*Physicochemical characterization of  $\beta$ -cyclodextrin and hydroxy ethyl  $\beta$ -cyclodextrin complexes of rifampicin*

B. PRAKASH RAO\*, SARASIJA SURESH<sup>1</sup>, C. NARENDRA<sup>2</sup>, BALASANGAMESHWER<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Al-Ameen College of Pharmacy, Hosur Road, Bangalore (India)-560027

<sup>2</sup>Krupanidhi College of Pharmacy, Koramangala, Bangalore-34

<sup>3</sup>National Tuberculosis Institute, Sadashiva Nagar, Bangalore-03

\* Dirección para comunicaciones: Visweswarapura Institute of Pharmaceutical Sciences, 2<sup>nd</sup> Floor, B.I.T. K.R.Road, Bangalore (India)-560 004 +91-80-26529390, Fax +91-80-26600661  
e-mail: [bpao\\_1111@rediffmail.com](mailto:bpao_1111@rediffmail.com)

## RESUMEN

Se realizó un ensayo con el objetivo de optimizar la administración oral de rifampicina mediante la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas, incluida la  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) y la hidroxietil- $\beta$ -ciclodextrina (HE $\beta$ -CD). El objetivo del estudio era incrementar la solubilidad y estabilidad de la rifampicina mediante la formación de complejos, y evaluar el efecto de la ciclodextrina en el tratamiento de la tuberculosis. Los estudios de solubilidad de fase mostraron que seguía una curva de solubilidad de tipo A y que la pendiente de la línea es inferior a uno, indicando la presencia de fármaco y agente aglutinante en una fracción molar de 1:1. Los complejos de ciclodextrina se prepararon mediante métodos de amasado (AM) y de disolvente común (DC). Las mezclas físicas también se prepararon en la misma proporción. En el caso de los complejos de  $\beta$ -CD, se observó una solubilidad dos veces mayor en el complejo preparado mediante disolvente común. Una espectometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) confirmó la formación de un complejo con (4-metil-1-piperazinil)-imino-metil de rifampicina de cadena lateral. La formación del complejo se confirmó mediante estudios de difracción de rayos-x de polvo, microscopía electrónica de barrido (MEB) y calorimetría diferencial de barrido (CDB). Se demostró que la actividad antituberculosa in vitro de la rifampicina se vio mejorada en el caso de todos los complejos indicados mediante una reducción a la mitad de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de rifampicina. La formación de complejos de inclusión con  $\beta$ -CD e hidroxietil- $\beta$ -ciclodextrina mejoró sus propiedades fisicoquímicas y su actividad antituberculosa in vitro.

PALABRAS CLAVE: Ciclodextrinas. Caracterización. Calorimetría diferencial de barrido (CDB). Espectometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), rifampicina, microscopía electrónica de barrido (MEB), estabilidad térmica, actividad antituberculosa in vitro.

## ABSTRACT

An attempt was made to optimize the oral delivery of rifampicin by formation of inclusion complexes with cyclodextrins including  $\beta$ -Cyclodextrin ( $\beta$ -CD), and hydroxy-ethyl- $\beta$ -cyclodextrin (HE $\beta$ -CD). The aim of the study was to increase the solubility, stability of rifampicin by way of complexation and to evaluate the effect of cyclodextrin on its anti-tubercular activity. The phase solubility studies showed that it followed Type-A<sub>L</sub> solubility curve and the slope of the line is less than one, indicating 1:1 molar ratio of drug to complexing agent. Cyclodextrin complexes were prepared by kneading (KN) and common solvent (CS) methods. The physical mixtures (PM) were also prepared in the same ratio. In case of  $\beta$ -CD complexes, a 2 fold increase in solubility was observed with CS complex. Formation of complex with side chain 4-methyl piperazin-1-ylimino-methyl of rifampicin was confirmed by FTIR. Formation of complex was confirmed by DSC, SEM, and powder x-ray diffraction studies. In vitro anti-tubercular activity of rifampicin was found to be enhanced

*in case of all the complexes indicated by a reduction in MIC of rifampicin to half. Inclusion complexation with  $\beta$ -CD and hydroxy ethyl  $\beta$ -cyclodextrin improved its physico-chemical properties and in vitro anti-tubercular activity.*

KEY WORDS: Cyclodextrins, characterization, DSC, FTIR, Rifampicin, SEM, and Thermal Stability, in vitro anti-tubercular activity.

## INTRODUCCIÓN

Las ciclodextrinas (CD) son oligosacáridos cíclicos, formados por unidades de (1,4)- $\alpha$ -D-glucopiranosas con un núcleo lipofílico y una superficie externa hidrofílica. Se utilizaron fundamentalmente como agentes de formación de complejos de inclusión para aumentar la solubilidad acuosa en los fármacos de baja solubilidad en agua y para aumentar su biodisponibilidad y estabilidad.<sup>1,2</sup> Además, las ciclodextrinas se utilizan para reducir la irritación gastrointestinal, para enmascarar olores o sabores desagradables y para impedir interacciones fármaco-aditivo y fármaco-fármaco.<sup>1,2</sup> Se observó una mejora de la estabilidad y solubilidad de la anandamida<sup>3</sup> por formación de complejos de hidroxietil- $\beta$ -ciclodextrina, y un aumento en la solubilidad y estabilidad de profármacos de pilocarpina<sup>4</sup> por  $\beta$ -CD y sus derivados. De forma similar, también se observó un aumento en la solubilidad de la glibenclamida por  $\beta$ -CD y sus derivados.<sup>5</sup> En el caso de la mitomicina C, se observó que la degradación se protege al formar complejos con ciclodextrinas, donde una parte de molécula está incluida en una molécula de ciclodextrina.<sup>6</sup>

La rifampicina es un fármaco de primera línea para el tratamiento de la tuberculosis, representado químicamente por (12 Z, 14 E, 24 E)-(2S, 16S, 17S, 18R, 19R, 20R, 21S, 22R, 23S)-1,2-dihidro-5, 6, 9, 17, 19-pentahidroxi-23-metoxi-2, 4, 16, 18, 20, 22-heptametil-8- (4-metil-1-piperazinil-imino metil)-1,11-dioxo-2, 7-(epoxi pentadeca-1, 11, 13-trienimino) nafto [2, 1-b] 21-furanil acetato.<sup>7</sup> El mecanismo de acción antibacteriana de la rifampicina consiste en la inhibición de la actividad de la enzima ARN polimerasa dirigida por ADN (DDRP).<sup>8</sup> Aunque el principal mecanismo de resistencia es la modificación de la enzima determinada, algunos tratamientos mutagénicos producen mutantes resistentes en los que la ARN polimerasa aún es muy sensible al fármaco, aunque el índice de absorción de rifampicina se reduzca.<sup>8</sup> Es ligeramente soluble en agua.<sup>9</sup> La rifampicina también es propensa a la hidrólisis ácida, originando 3-formil-rifampicina SV en la que la cadena lateral (4-metil-1-piperazinil)-imi-

## INTRODUCTION

Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides, consisting of (1-4)-linked  $\alpha$ -D-glucopyranose units with somewhat lipophilic core and a hydrophilic outer surface. They have mainly been used as inclusion complexing agents to increase aqueous solubility of poorly water-soluble drugs and to increase their bioavailability and stability.<sup>1,2</sup> In addition, cyclodextrins are used to reduce gastrointestinal irritation, to mask unpleasant odor or taste and to prevent drug-drug and drug-additive interactions.<sup>1,2</sup> Improved solubility and stability of anandamide<sup>3</sup> by HP $\beta$ -CD complexation, and increase solubility and stability of pilocarpine prodrugs<sup>4</sup> by  $\beta$ -CD and its derivatives has been reported. Similarly, it was also reported that solubility of glibenclamide was increased by  $\beta$ -CD and its derivatives.<sup>5</sup> In case of mitomycin C, degradation was reported to be protected when complexed with cyclodextrins, where a part of molecule was reported to be enclosed in CD molecule.<sup>6</sup>

Rifampicin is first-line anti-tubercular drug, chemically (12 Z, 14 E, 24 E)-(2S, 16S, 17S, 18R, 19R, 20R, 21S, 22R, 23S)-1,2-dihydro-5, 6, 9, 17, 19-pentahydroxy-23-methoxy-2, 4, 16, 18, 20, 22-heptamethyl-8- (4-methyl piperazin-1-ylimino-methyl)-1,11-dioxo-2, 7-(epoxy pentadeca-1, 11, 13-trienimino) naphtho [2, 1-b] furan-21-yl acetate.<sup>7</sup> The mechanism of antibacterial action of rifampicin is inhibition of the activity of the enzyme DNA-directed RNA polymerase (DDRP).<sup>8</sup> Although the main mechanism of resistance is the modification of the target enzyme, some mutagenic treatments yield resistant mutants in which the RNA polymerase is still highly sensitive to the drug, but the rate of rifampicin uptake is reduced.<sup>8</sup> It is slightly soluble in water.<sup>9</sup> Rifampicin is also prone to acid hydrolysis giving rise to 3-formylrifampicin SV where side chain (4-methyl piperazin-1-ylimino-methyl) is detached resulting in decreased oral absorption (Fig 1). Rifampicin is also prone to auto oxidation of the paraphenolic group in the naphthalene ring to give the p-quinone.<sup>10</sup> Its oral absorption is decreased when side chain, 4-methyl piperazin-1-ylimino-methyl

no-metil se separa, provocando una disminución de la absorción oral (Figura 1). La rifampicina también es propensa a la auto-oxidación del grupo parafenólico en el anillo de naftaleno para producir la p-quinona.<sup>10</sup> Su absorción oral se reduce cuando se separa la cadena lateral, (4-metil-1-piperazinil)-imino-metil.<sup>11</sup> El tratamiento con rifampicina puede producir efectos gastro-intestinales nocivos<sup>9</sup> a largo plazo, tales como náuseas, vómitos, anorexia, diarrea, molestias epigástricas y otros efectos secundarios.

is detached.<sup>11</sup> Long term therapy of rifampicin results in gastrointestinal adverse effects<sup>9</sup> like nausea, vomiting, anorexia, diarrhoea, epigastric distress and other side effects

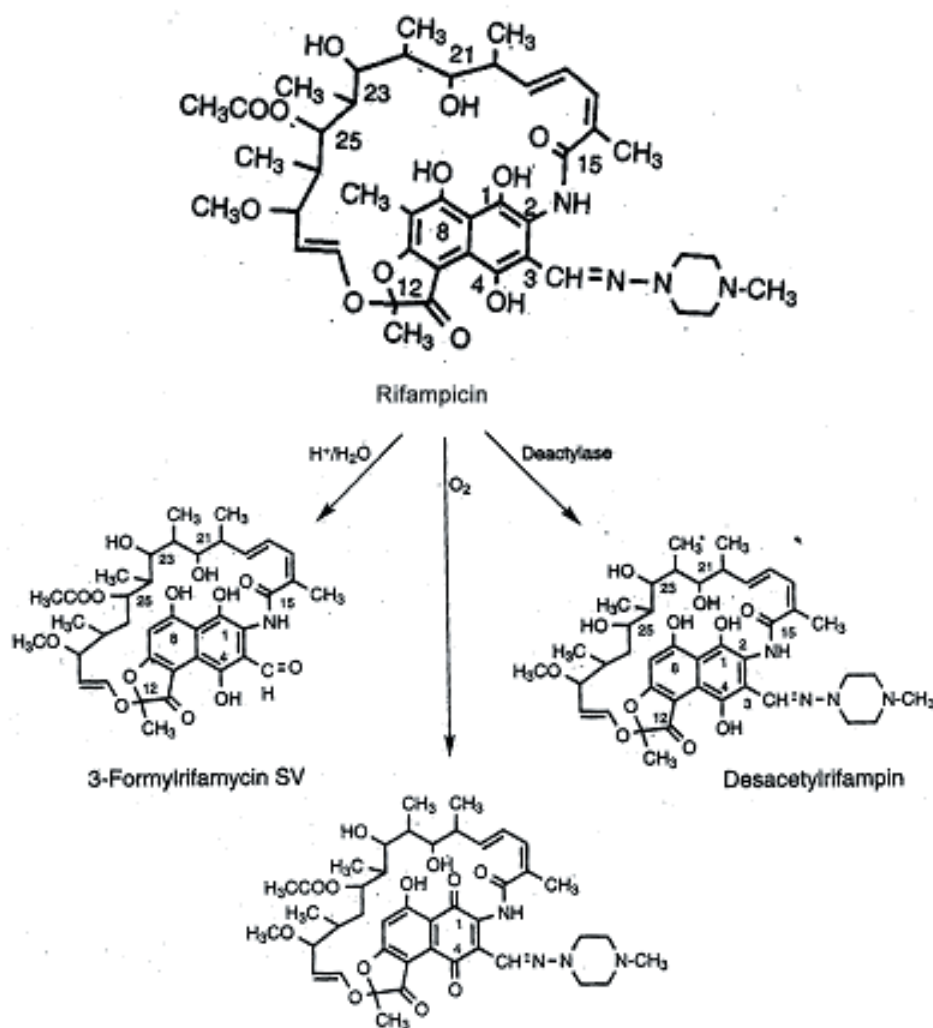


Fig. 1 : Degradation of Rifampicin

En este estudio se describe la preparación y evaluación de complejos de  $\beta$ -ciclodextrina y su derivado, hidroxietil- $\beta$ -ciclodextrina, para aumentar la estabilidad química y solubilidad acuosa de la rifampicina. Se observó que las ciclodextrinas aumentan la solubilidad y, por lo

This paper describes the preparation and evaluation of complexes of  $\beta$ -Cyclodextrin ( $\beta$ -CD) and its derivative, hydroxy-ethyl- $\beta$ -cyclodextrin (HE $\beta$ -CD) in order to increase aqueous solubility and chemical stability of rifampicin. Cyclodextrins (CDs) have been reported to increase the

tanto, la estabilidad, de la molécula de fármaco. El aumento de la estabilidad de la rifampicina maximizaría y mantendría la absorción oral de la rifampicina durante más tiempo mediante la protección de su cadena lateral lábil (4-metil-1-piperazinil)-imino-metil. Los complejos de fármacos formados por ciclodextrinas se caracterizaron mediante estudios de solubilidad de fase, FTIR, CDB, MEB y estudios de difracción de rayos-x de polvo. Se evaluó el efecto de la formación de complejos en la actividad antituberculosa in vitro de la rifampicina. Se realizaron estudios de estabilidad térmica, de acuerdo con las directrices establecidas, para evaluar el efecto de la formación de complejos en la estabilidad de la rifampicina.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La  $\beta$ -CD se adquirió a los laboratorios HiMedia Laboratories Pvt Limited, Mumbai (India) y la HE $\beta$ -CD fue una muestra gratuita de Cerestar USA, Inc Indiana (EE.UU.). La rifampicina fue una muestra gratuita de KAPL, Bangalore (India). El resto de productos químicos eran de grado analítico y se utilizó agua bidestilada. Los productos químicos procedentes de Sigma Aldrich Chemie GmbH en Steinheim (Alemania) se utilizaron para la preparación de medio Lowenstein-Jensen (medio L.J.). Se adquirieron metanol (Qualigens Fine chemicals, Mumbai, India) y agua grado HPLC (Merck Limited, Mumbai, India).

### *Estudio de solubilidad de fase*

Se realizaron estudios de solubilidad de fase de acuerdo con el método descrito por Higuchi y Connors.<sup>12, 13</sup> Se añadió el exceso de rifampicina a 10 ml de una solución acuosa de cada ciclodextrina a distinta concentración (0-80 mM) excepto en el caso de la  $\beta$ -CD donde la máxima concentración es 15 mM, en una serie de matraces cónicos taponados de 25 ml. Las mezclas se agitaron durante 48 horas a temperatura ambiente en un baño María con agitador para conseguir equilibrio. Tras agitar durante 48 horas para alcanzar el equilibrio, se extrajeron alícuotas (2 ml) a intervalos y se filtraron inmediatamente con un filtro de disco de nylon de 0,45. La suspensión se equilibró a temperatura ambiente a temperatura

solubility and thereby stability of drug molecule. Increase of stability rifampicin would maximize and maintain oral absorption of rifampicin for longer period of time by protecting its labile 4-methyl piperazin-1-ylimino-methyl side chain. Drug-CD complexes were characterized by phase solubility studies, FTIR, DSC, SEM and powder x-ray diffraction studies. Effect of complexation on in vitro anti-tubercular activity of rifampicin was evaluated. Thermal stability studies were carried out according guidelines to evaluate the effect of complexation on the stability of rifampicin.

## MATERIAL AND METHODS

$\beta$ -CD was purchased from HiMedia Laboratories Pvt Limited, Mumbai, India and HE $\beta$ -CD was obtained as gift sample from Cerestar USA, Inc Indiana, USA. Rifampicin was obtained as gift sample from KAPL, Bangalore, India. All other chemicals used were A.R.grade and double distilled water was used. The chemicals from Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany were used for the preparation of Lowenstein-Jensen medium (L.J. medium). HPLC grade water (Merck Limited, Mumbai, India) and methanol (Qualigens Fine chemicals, Mumbai) were purchased.

### *Phase Solubility Study*

Phase solubility studies were carried according to method described by Higuchi and Connors.<sup>12, 13</sup> Excess of rifampicin was added to 10 ml of an aqueous solution of each cyclodextrin at a different concentration (0-80 mM) except in case of  $\beta$ -CD where the maximum concentration is 15 mM. in a series of 25 ml stoppered conical flasks and the mixtures were shaken for 48 hours at room temperature on a shaker water bath to obtain equilibrium. After 48 hours shaking to achieve equilibrium, 2-ml aliquots were withdrawn at intervals and filtered immediately using a 0.45 nylon disc filter. The suspension was equilibrated at room temperature for 24 hours. At equilibrium, the content of the solubilized rifampicin was determined spectrophotometrically at 475 nm (Shimadzu Model 1601)<sup>7</sup> The blanks were performed on the same concentrations of CDs in water to nullify any absorbance that may be

ambiente durante 24 horas. Una vez en equilibrio, se determinó el contenido de la rifampicina solubilizada de forma espectrofotométrica a 475 nm (Shimadzu Model 1601)<sup>7</sup>. Se realizaron muestras en blanco a las mismas concentraciones de CD en agua para invalidar cualquier absorbencia que pudieran mostrar las moléculas de CD. Este estudio se realizó por triplicado. Se calculó la constante de estabilidad ( $K_s$ ) de cada complejo formado mediante una estequiometría 1:1, tal como se muestra a continuación:

$$\frac{\text{pendiente}}{S_o (1-\text{pendiente})} = K_{1:1}$$

Donde  $S_o$  es la solubilidad intrínseca de la rifampicina.

#### *Preparación de los complejos*

Se utilizaron distintos métodos para la preparación de los complejos de β-CD de rifampicina como, por ejemplo, el método de amasado y el método de disolvente común<sup>14</sup>. Para la preparación mediante todos los métodos se utilizó fármaco y CD en una fracción molar de 1:1. También se preparó la mezcla física (MF) de fármaco y β-CD.

**Mezcla física:** El fármaco y la CD en una fracción molar de 1:1 se introdujeron en el mortero en proporción geométrica y la mezcla se trituró durante una hora. El polvo seco obtenido se pasó por un tamiz del número 85 y se almacenó en un desecador.

**Método de amasado:** Al fármaco y la CD en una fracción molar de 1:1 se agregó agua destilada adecuada para darle consistencia de pasta. La pasta se amasó durante media hora y se secó en un horno a temperatura ambiente durante una semana. A continuación, la masa obtenida se molió, se pasó por un tamiz del número 85 y se almacenó en un desecador.

**Método de disolvente común (Coevaporación):** El fármaco y la CD se disolvieron en dimetilformamida en el caso de la β-CD y en cloroformo en el caso de la HEβ-CD, en una proporción 1:1 por separado. Las soluciones se mezclaron y evaporaron a sequedad a temperatura ambiente. La masa seca obtenida se molió, se pasó por

exhibited by the CD molecules. This study was carried out in triplicate. The stability constant ( $K_s$ ) of each complex formed was calculated on basis of 1:1 stoichiometry as follows

$$\frac{\text{slope}}{S_o (1-\text{slope})} = K_{1:1}$$

Where  $S_o$  is the intrinsic solubility of rifampicin.

#### *Preparation of the Complexes*

Different methods were used for the preparation of β-CD complexes of rifampicin such as common solvent (CS)<sup>14</sup>, and kneading (KN) method. In all the methods 1:1 molar ratio of drug to CD was taken for preparation. Physical mixture (PM) of drug and β-CDs was also prepared.

**Physical Mixture:** 1:1 molar ratio of drug to CD was taken in mortar in geometrical ratio and triturated for one hour. The dry powder obtained was passed through the sieve No. 85 and stored in a desiccator.

**Kneading Method:** 1:1 molar ratio of drug to CD was taken and adequate distilled water was added to make paste-like consistency. The paste was kneaded for half an hour and dried in an oven at RT for one week. The obtained mass was then ground and passed through Sieve No. 85 and stored in a desiccator.

**Common Solvent (CS) (Co evaporation) Method:** The drug and CD were dissolved in dimethyl formamide in case of β-CD, chloroform in case of HEβ-CD in 1:1 ratio separately. The solutions were mixed together and evaporated to dryness at RT. The dry mass obtained was ground and passed through the sieve No. 85 and stored in a desiccator.

#### *Content Uniformity*

The molar percentage of rifampicin in each of complexes was determined by using the complex containing 100 mg of the drug. The concentration of rifampicin after suitable dilution with pH 7.4 phosphate buffer was determined at 475 nm by



un tamiz del número 85 y se almacenó en un desecador.

#### *Uniformidad del contenido*

El porcentaje molar de rifampicina de cada complejo se determinó mediante el complejo que contenía 100 mg de fármaco. La concentración de rifampicina tras la dilución adecuada con tampón fosfato pH 7,4 se determinó a 475 nm mediante el espectrofotómetro de UV Shimadzu de doble haz modelo UV-1601.<sup>7</sup>

Se investigaron los complejos de  $\beta$ -CD para evaluar la integridad del fármaco en el complejo y establecer la formación del complejo mediante los métodos de difracción de rayos-x de polvo, la microscopía electrónica de barrido (MEB), la calorimetría diferencial de barrido (CDB) y la espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

#### *Estudios de solubilidad*

Se determinó la solubilidad de la rifampicina pura y los complejos tal como se ha indicado.<sup>15</sup> Se agregó exceso de fármaco puro o el complejo a un matraz cónico de 25 ml y la mezcla se agitó durante 24 horas en un baño María con agitador termostático (modelo REMI) a temperatura ambiente con una velocidad de 110-120 golpes/min, hasta que se obtuvo una solución saturada en agua destilada. Las muestras se retiraron a intervalos, se filtraron con un filtro de disco de nylon de 0,45 diluido adecuadamente y se determinó de forma espectrofotométrica la concentración de fármaco a 475 nm tal como se ha descrito anteriormente. El experimento se detuvo una vez alcanzada una solubilidad constante. La muestra se filtró.

#### *Estudios de espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)*

Se realizó una espectroscopia de infrarrojos para los complejos de a) fármaco puro, b)  $\beta$ -CD, c) HE $\beta$ -CD y d)  $\beta$ -CD-R, HE $\beta$ -CD-R mediante el espectrómetro Shimadzu modelo 8700.

using Shimadzu double beam UV spectrophotometer model UV-1601.<sup>7</sup>

$\beta$ -CD complexes were investigated to evaluate the intactness of the drug in the complex and to establish formation of complex by FTIR, DSC, SEM and powder x-ray diffraction methods.

#### *Solubility Studies*

The solubility of pure rifampicin and the complexes was determined as reported.<sup>15</sup> Excess of pure drug or the complex added to 25 ml conical flask and the mixture was shaken for 24 hours in a thermostatic shaker water bath (REMI Model) at RT at the rate of 110-120 strokes/min, till a saturated solution in distilled water was obtained. At intervals the samples were withdrawn, filtered using a 0.45 nylon disc filter suitably diluted and the concentration of drug determined spectrophotometrically at 475 nm as described above and when constant solubility was reached the experiment was stopped. The sample was filtered

#### *FTIR Studies*

IR spectroscopy was carried out for the following a) pure drug, b)  $\beta$ -CD, c) HE $\beta$ -CD and d)  $\beta$ -CD-R, HE $\beta$ -CD-R complexes using Shimadzu FTIR model 8700.

#### *Differential Scanning Calorimeter Studies*

Differential scanning calorimetry of pure drug, its physical mixture of  $\beta$ -CD, HE $\beta$ -CD and all the complexes were carried out using Perkin Elmer Pyris with a temperature increase of 5° C /min. The scanning temperature range was from 50° to 250°C. Temperature and heat flow calibration were performed using indium as a standard.

#### *Powder X-ray Diffraction Studies*

X-ray diffraction of pure drug,  $\beta$ -CD, HE $\beta$ -CD and their complexes of rifampicin were carried out using Philips Diffractometer Model PW 17291 for  $\beta$ -CD complexes and Model PW 1050/37 for HE $\beta$ -CD with a vertical goniometric using

### *Estudios de calorimetría diferencial de barrido*

Se realizó la calorimetría diferencial de barrido del fármaco puro, su mezcla física de  $\beta$ -CD, HE $\beta$ -CD y todos los complejos mediante el calorímetro diferencial de barrido Perkin Elmer Pyris con un aumento de temperatura de 5 °C/min. El intervalo de temperatura de barrido estaba comprendido entre 50 y 250 °C. La calibración de flujo térmico y temperatura se realizó utilizando indio como estándar.

### *Estudios de difracción de rayos-x de polvo*

La difracción de rayos-x del fármaco puro,  $\beta$ -CD, HE $\beta$ -CD y sus complejos de rifampicina se realizaron con un difractómetro Philips modelo PW 17291 en el caso de los complejos de  $\beta$ -CD y con el modelo PW 1050/37 en el caso de la HE $\beta$ -CD. Se utilizó un dispositivo goniométrico vertical con un filtro de níquel, una radiación de Cu  $k_{\alpha}$ , funcionando a 30 KW y 20 miliamperios en un ángulo comprendido en el intervalo entre 5° y 40° a una velocidad de barrido de 1°/min.

### *Microscopía electrónica de barrido*

La morfología de la superficie de los materiales puros, sus homólogos tratados y todos los sistemas binarios se examinaron mediante microscopía electrónica de barrido. Las muestras se fijaron en un portamuestras con cinta adhesiva de doble cara y, a continuación, se recubrieron de oro en vacío con un metalizador. Las imágenes se tomaron con un voltaje de excitación de 20 KV. Se utilizó un microscopio de barrido JSM-840 de Jeol (Japón), con un dispositivo de pulverización iónica JFC-1100E.

### *Estudios de estabilidad*

Estudios de estabilidad acelerada: Los estudios de estabilidad térmica se realizaron en una cámara de estabilidad Digico. Las muestras se conservaron a  $25 \pm 1$  °C/60% de humedad relativa  $\pm 5\%$ , por triplicado junto con la muestra pura en viales de cristal durante seis meses. Se recolectaron muestras todos los meses y se determinó la concentración tras la dilución adecuada en la

a Nickel filter Cu  $k_{\alpha}$  radiation operating at 30 KW and 20 milli amps in the range from 5°-40° angle at the scanning rate of 1°/min.

### *Scanning Electron Microscopy*

The surface morphology of pure materials, their treated counterparts, and all binary systems were examined by scanning electron microscope (SEM). The samples were fixed on a brass stub using double-sided tape and then gold coated in vacuum by a sputter coater. The pictures were taken at an excitation voltage of 20 KV. JSM-840A Scanning Microscope, Jeol-Japan, with JFC-1100E Ion Sputtering Device was used.

### *Stability Studies*

Accelerated Stability Studies: The thermal stability studies are carried in Digico Stability Chamber. The samples were kept  $25^{\circ} \pm 1^{\circ}$  C/60% RH  $\pm 5\%$  as it is stored at cool temperature for six months in triplicate along with pure sample for six months in a glass vials. The samples were collected every month and the concentration was determined after diluting suitably in the mobile phase by using HPLC at 254 nm.<sup>16</sup>

The samples were collected at zero time afterwards every month and the concentration was determined after diluting suitably in the mobile phase by using the HPLC method<sup>16</sup> at 254 nm.

HPLC System: The liquid chromatography consisted of a Waters 6000 A pump, a U6K injector with a 25 loop (Waters Assoc., Milford, MA, U.S.A.) and a variable-wavelength W 2487 UV detector. Analyses were performed on reversed-phase symmetry C<sub>18</sub> 5  $\mu$ m W032815 4.6 x 150 mm. The operating conditions for the HPLC system: Composition of mobile phase is methanol and 0.015 disodium hydrogen phosphate in 75:25 v/v rates, pH adjusted to 4.5 with 85% phosphoric acid. Flow rate was (isocratic) 1 ml/min, ambient temperature ( $25 \pm 1^{\circ}$  C); UV detector wavelength 254 nm; sensitivity scale, 0-0.01 a.u.f.s.

fase móvil mediante HPLC a 254 nm.<sup>16</sup>

Se recopilaron muestras en tiempo muerto después de cada mes y se determinó la concentración tras la dilución adecuada en la fase móvil mediante el método HPLC<sup>16</sup> a 254 nm.

**Sistema HPLC:** En la cromatografía líquida se utilizaron una bomba Waters 6000 A, un inyector U6K con un volumen de inyección de 25 (Waters Assoc., Milford, MA, EE.UU.) y un detector de UV W 2487 de longitud de onda variable. Los análisis se realizaron en una columna de fase inversa Symmetry C<sub>18</sub> (5 µm, W03281, 4,6 x 150 mm). A continuación se especifican las condiciones de funcionamiento del sistema HPLC: La composición de la fase móvil es metanol y 0,015 de fosfato dibásico de sodio (75:25 v/v). El pH se ajustó a 4,5 con un 85% de ácido fosfórico. La velocidad de flujo fue (isocrática) 1 ml/min; temperatura ambiente (25±1 °C); detector de UV con una longitud de onda de 254 nm; escala de sensibilidad 0-0,01 a.u.f.s.

#### *Susceptibilidad del fármaco*

Se realizó la prueba de susceptibilidad<sup>17</sup> in vitro del fármaco puro y sus complejos con medio L.J. mediante el método de concentración inhibitoria mínima (CIM) en la cepa natural número 10934. La rifampicina y sus complejos se disolvieron en dimetilformamida, se esterilizaron pasándolos a través de un filtro de membrana y se agregaron al medio L.J. Se utilizaron las concentraciones 16 µg/ml, 32 µg/ml y 64 µg/ml en la cepa natural número 10934 (conservada en National Institute of Tuberculosis, Bangalore) en el medio final. Se utilizó medio L.J. sin fármaco en frascos McCartney para las pendientes de control. También se utilizaron dos controles planos. Los frascos se inclinaron en el coagulador a 85° C durante 1 hora y 25 minutos, y se incubaron durante 28 días a 37° ± 1 C.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### *Estudios de solubilidad de fase*

Los estudios de solubilidad de fase mostraron que la pendiente de la línea de solubilidad es inferior a uno, lo que indica la formación de

#### *Drug Susceptibility*

In vitro drug susceptibility<sup>17</sup> was carried out for pure drug and its complexes using L.J. Media by minimum inhibitory concentration (MIC) method on wild strain No 10934. Rifampicin and its complexes were dissolved in dimethyl formamide, sterilized by passing through membrane filter and added to L.J. media. The concentration 16 µg/ml, 32 µg/ml, and 64 µg/ml were used on wild strain No 10934 (Maintained in National Institute of Tuberculosis, Bangalore) in the final media. L.J. medium without drug was used for control slopes in Mc Cartney bottles. Two plain controls were also used. The bottles were sloped in the inspissator at 85° C for 1 hour 25 minutes and incubated for 28 days at 37° ± 1 C.

## RESULTS AND DISCUSSIONS

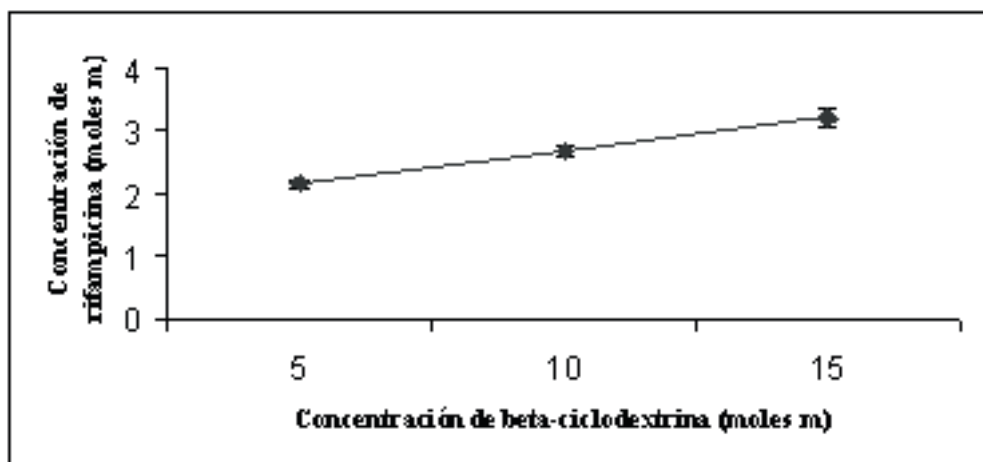
#### *Phase Solubility Studies*

Phase solubility studies showed that the slope of the solubility line is less than one, which indicate the formation of 1:1 molar ratio and follows Type-A<sub>L</sub> phase (Fig 2 and 3) solubility.<sup>12, 13</sup> The apparent 1:1 stability constants of both complexes were calculated. HEβ-CD complexes showed highest stability constants, which indicates maximum interaction. The stability constants found to be 58.13 ± 2.90, 76.35 ± 1.37 for β-CD and HEβ-CD respectively.



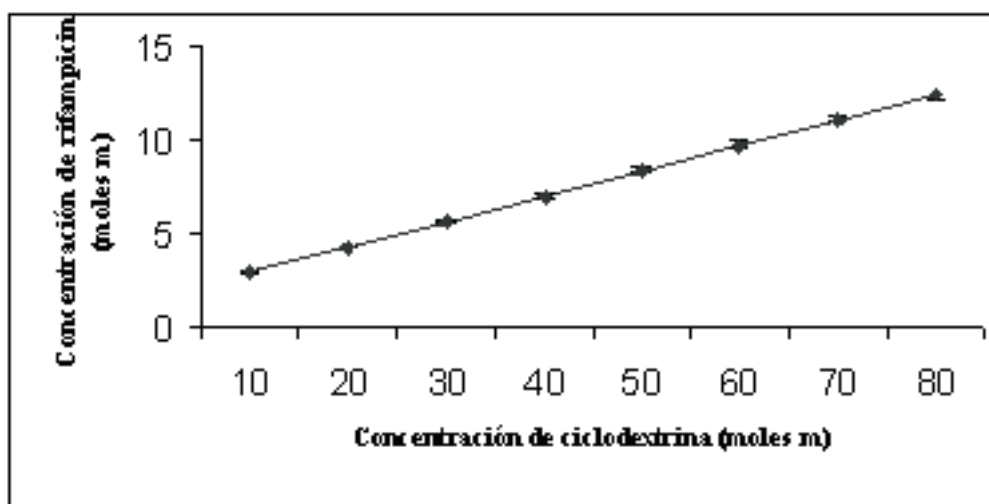
una fracción molar de 1:1 posterior a la solubilidad de fase de tipo  $A_L$  (Figuras 2 y 3).<sup>12, 13</sup> Se calcularon las constantes de estabilidad 1:1 aparentes de ambos complejos. Los complejos de HE $\beta$ -CD mostraron constantes de estabilidad superiores, lo que indica una interacción máxima. Las constantes de estabilidad fueron  $58,13 \pm 2,90$  y  $76,35 \pm 1,37$  para  $\beta$ -CD y HE $\beta$ -CD, respectivamente.

**FIGURA 2.** El diagrama de solubilidad de fase de la  $\beta$ -CD y la rifampicina.  
**FIGURE 2.** The phase solubility diagram of  $\beta$ -CD and rifampicin.



Cada valor representa la media  $\pm$  la desviación estándar de  $n=3$   
 Each value is mean  $\pm$  standard deviation of  $n=3$

**FIGURA 3.** El diagrama de solubilidad de fase de la HE $\beta$ -CD y la rifampicina.  
**FIGURE 3.** The phase solubility diagram of HE $\beta$ -CD and rifampicin.



Cada valor representa la media  $\pm$  la desviación estándar de  $n=3$   
 Each value is mean  $\pm$  standard deviation of  $n=3$

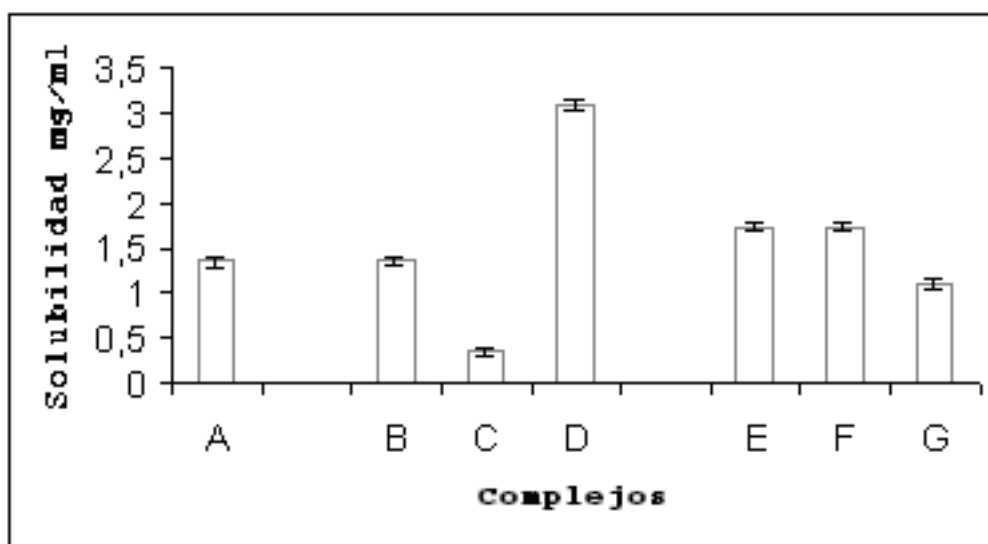
### Solubilidad

La solubilidad del fármaco puro y sus complejos de CD se muestra en la Figura 4. En el caso de los complejos de  $\beta$ -CD, el complejo preparado mediante disolvente común mostró una solubilidad dos veces mayor que la del fármaco puro mientras que el complejo preparado mediante amasado mostró la menor solubilidad, menor que la del fármaco puro. Los complejos de HE $\beta$ -CD no mostraron ningún cambio significativo en la solubilidad de la rifampicina.

### Solubility

The solubility of pure drug and its CD complexes were shown in the Fig. 4. In case of  $\beta$ -CD complexes, CS complex showed 2 fold increase in solubility over pure drug while KN complex showed the least solubility, less than that of the pure drug. HE $\beta$ -CD did not show any significant change in solubility of rifampicin.

**FIGURA 4.** Solubilidad de la rifampicina y sus complejos en agua.  
**FIGURE 4.** The phase solubility diagram of HE $\beta$ -CD and rifampicin.



Cada valor representa la media  $\pm$  la desviación estándar de  $n=3$

Solubilidad de rifampicina pura (A), (B)  $\beta$ -CD-rifampicina preparada mediante mezcla física, (C)  $\beta$ -CD-rifampicina preparada mediante amasado, (D)  $\beta$ -CD-rifampicina preparada mediante disolvente común, (E) HE $\beta$ -CD-rifampicina preparada mediante mezcla física, (F) HE $\beta$ -CD-rifampicina preparada mediante amasado, (G) HE $\beta$ -CD-rifampicina preparada mediante disolvente común.

Each value is mean  $\pm$  standard deviation of  $n=3$

Solubility of (A) pure rifampicin, (B)  $\beta$ -CD-rifampicin prepared by physical mixture, (C)  $\beta$ -CD-rifampicin prepared by kneading, (D)  $\beta$ -CD-rifampicin prepared by common solvent, (E) HE $\beta$ -CD-rifampicin prepared by physical mixture, (F) HE $\beta$ -CD-rifampicin prepared by kneading, (G) HE $\beta$ -CD-rifampicin prepared by common solvent.

### Uniformidad del contenido

Se determinó el contenido de fármaco real de cada mezcla binaria. Los resultados se muestran en la Tabla 1. La mezcla física de productos disolventes comunes y amasados mostró una buena concordancia entre el contenido de fármaco teórico y real.

### Content Uniformity

The actual drug content in each binary mixture was determined. The results are reported in Table 1. The physical mixture, kneaded and common solvent products showed a good agreement between theoretical and actual drug content.

**TABLA 1.** Contenido de fármaco en mezclas binarias (% fracción molar  $\pm$  MEB).

**TABLE 1.** Drug content in binary mixtures (% molar ratio  $\pm$  SEM).

Método de formación de complejos de preparación de agente teórico (%) real(%) <i>Complexing Method of Theoretical (%) Actual(%)</i>			
$\beta$ -CD	MF	50	49,20 $\pm$ 0,16
	AM	50	48,77 $\pm$ 0,88
	DC	50	49,43 $\pm$ 0,88
HE $\beta$ -CD	MF	50	49,70 $\pm$ 0,06
	AM	50	48,80 $\pm$ 0,06
	DC	50	49,50 $\pm$ 0,12

Cada valor representa la media  $\pm$  la desviación estándar de n=3.  
 Each value is mean  $\pm$  standard deviation of n=3.

### *Estudios de espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)*

El espectro FTIR de los complejos de  $\beta$ -CD mostró que muchos grupos funcionales de rifampicina podrían haber interactuado con la  $\beta$ -CD. Se produjo un desplazamiento del estiramiento característico del grupo -OH de 3428,2  $\text{cm}^{-1}$  a 3324,5  $\text{cm}^{-1}$ , y del enlace  $>\text{C}=\text{O}$  del ácido carboxílico insaturado  $\alpha,\beta$  de 1724,2  $\text{cm}^{-1}$  a 1715,6  $\text{cm}^{-1}$  en la mezcla física (Figura 5). La disminución en la frecuencia de grupos funcionales es indicativa de la formación de un enlace de hidrógeno con el hidrógeno del grupo hidroxilo de ciclodextrina que produce un alargamiento del enlace O-H debido a una reducción de la elasticidad.<sup>18</sup> El estiramiento del enlace  $>\text{C}=\text{N}$  se desplazó de 1644,2  $\text{cm}^{-1}$  a 1629,7  $\text{cm}^{-1}$  en el caso de la mezcla física y el pico a 2883,4  $\text{cm}^{-1}$  de C-H alifático desapareció, lo que indica la formación de un complejo con una parte de molécula de rifampicina con (4-metil-1-piperazinil)-imino-metil. La espectrometría FTIR del complejo preparado mediante amasado indica un cambio similar al observado en el caso de la mezcla física de rifampicina. El estiramiento del enlace  $>\text{C}=\text{O}$  del ácido carboxílico insaturado  $\alpha,\beta$  se desplazó de 1724,2  $\text{cm}^{-1}$  a 1715,6  $\text{cm}^{-1}$ , lo que también indica la formación de un enlace de hidrógeno. El pico a 2883,4  $\text{cm}^{-1}$  de C-H alifático desapareció, el estiramiento del enlace -C-H se desplazó de 2937,4  $\text{cm}^{-1}$  a 2925,8  $\text{cm}^{-1}$ , y la deformación del enlace -C-H se desplazó de 1432,0 a 1441,7  $\text{cm}^{-1}$ , lo que indica una interacción de los grupos metilo. Se observaron reducciones en la intensidad de los picos en el caso del complejo

### *FTIR Studies*

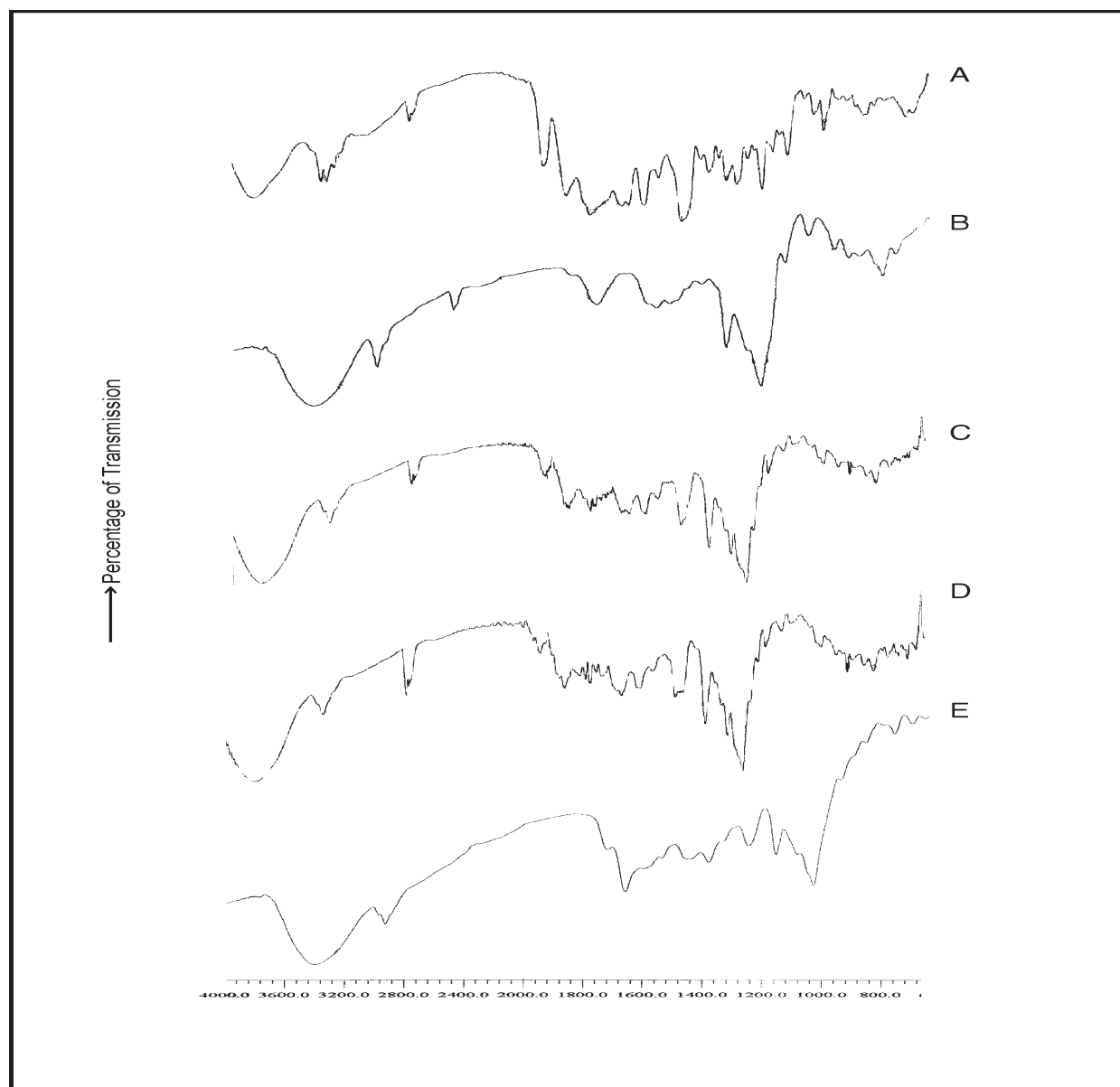
FTIR spectra of  $\beta$ -CD complexes showed that many functional groups of rifampicin might have interacted with the  $\beta$ -CD. The characteristic stretch of -OH from 3428.2  $\text{cm}^{-1}$  to 3324.5  $\text{cm}^{-1}$ , stretch of  $>\text{C}=\text{O}$  of  $\alpha,\beta$  unsaturated carboxylic acid from 1724.2  $\text{cm}^{-1}$  to 1715.6  $\text{cm}^{-1}$  were shifted in the PM (Fig. 5). The lowering in frequency of functional groups indicates formation of hydrogen bond with the hydrogen of hydroxyl group of cyclodextrin which has resulted in lengthening of band O-H due to reduction in elasticity.<sup>18</sup> The  $>\text{C}=\text{N}$  stretch has shifted from 1644.2  $\text{cm}^{-1}$  to 1629.7  $\text{cm}^{-1}$  were shifted in case of physical mixture and peak at 2883.4  $\text{cm}^{-1}$  of aliphatic C-H has disappeared, which has indicated formation of complex with a part of molecule of rifampicin with 4-methyl piperazin-1-ylimino-methyl. FTIR of KN complex indicated change similar that observed in case of PM of rifampicin. The stretch of  $>\text{C}=\text{O}$  of  $\alpha,\beta$  unsaturated carboxylic acid was shifted from 1724.2  $\text{cm}^{-1}$  to 1715.6  $\text{cm}^{-1}$ , which also indicates the hydrogen bond formation. The peak at 2883.4  $\text{cm}^{-1}$  of C-H of aliphatic was disappeared, the stretch of -C-H at 2937.4  $\text{cm}^{-1}$  was shifted to 2925.8  $\text{cm}^{-1}$ , and also the -C-H deformation at 1432.0 was shifted to 1441.7  $\text{cm}^{-1}$ , which indicated that the methyl groups interacted. Reductions in the intensities of peaks were observed in case of CS complex. From the above data it could be concluded that the side chain, 4-methyl piperazin-1-ylimino-methyl may be included in the core of  $\beta$ -CD in PM and some groups were interacted with  $\beta$ -CD in PM and KN by the way of formation of hydrogen

preparado mediante disolvente común. De los datos anteriores se puede concluir que la cadena lateral, (4-metil-1-piperazinil)-imino-metil, se puede incluir en el núcleo de  $\beta$ -CD en la mezcla física y que algunos grupos interactuaron con la  $\beta$ -CD en la mezcla física y en el complejo preparado mediante disolvente común por medio de la formación de enlaces de hidrógeno. Por tanto, se pudieron obtener complejos de rifampicina en la  $\beta$ -CD, donde se puede incluir una parte del fármaco en la cavidad de la ciclodextrina.

bonds. Thus complexation of rifampicin could be obtained in  $\beta$ -CD where a part of drug may be included within the cyclodextrin cavity.

**FIGURA 5.** Espectro FTIR de (A) rifampicina pura, (B)  $\beta$ -CD, (C)  $\beta$ -CD-rifampicina preparada mediante mezcla física, (D)  $\beta$ -CD-rifampicina preparada mediante amasado y (E)  $\beta$ -CD-rifampicina preparada mediante disolvente común.

**FIGURE 5.** FTIR spectra of (A) pure rifampicin, (B)  $\beta$ -CD, (C)  $\beta$ -CD-rifampicin prepared by physical mixture, (D)  $\beta$ -CD-rifampicin prepared by kneading and (E)  $\beta$ -CD-rifampicin prepared by common solvent.

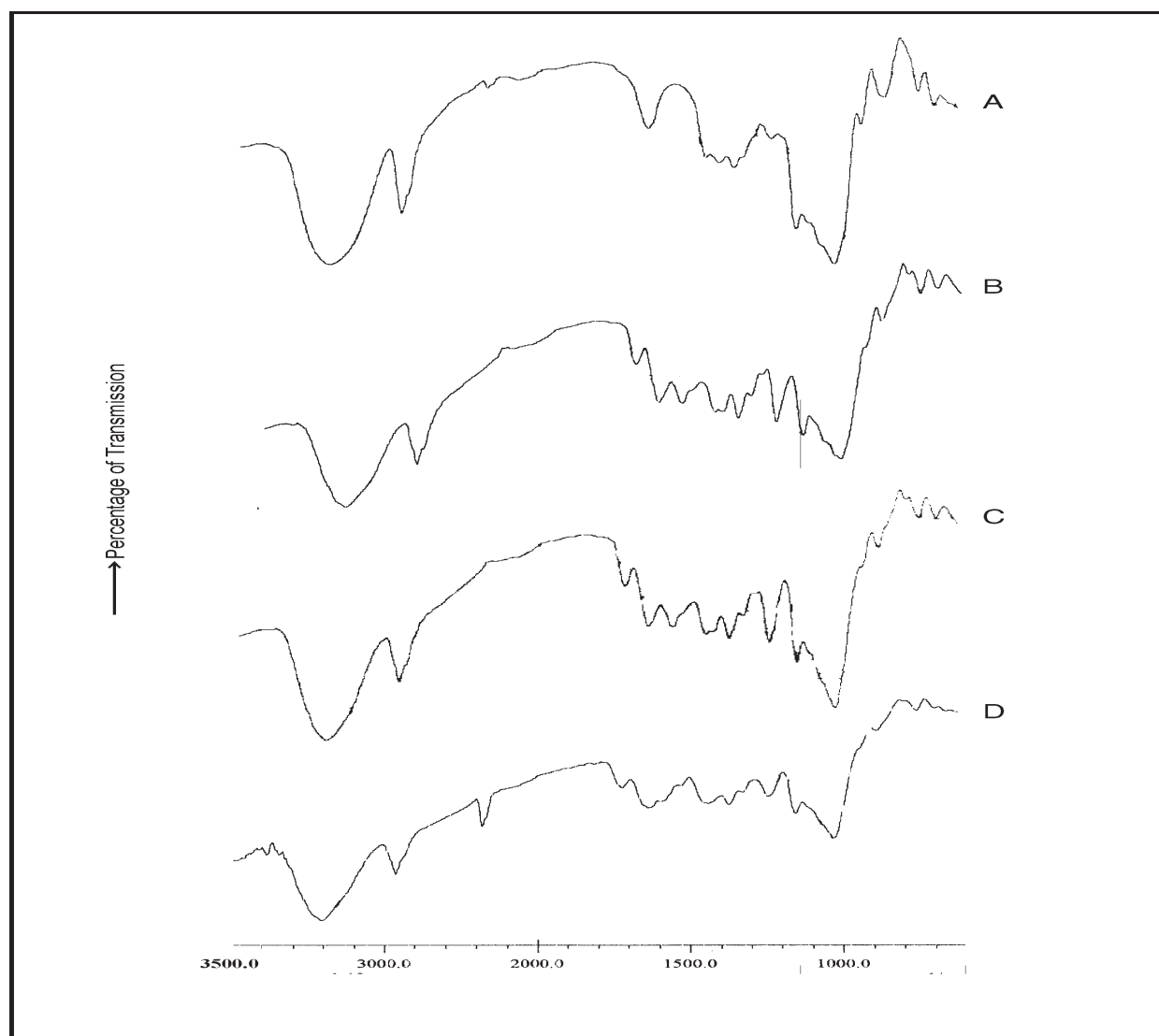


En el espectro FTIR de HE $\beta$ -CD (Figura 6), se produjo un desplazamiento del pico del enlace -C-H de 1436,9  $\text{cm}^{-1}$  a 1429,2  $\text{cm}^{-1}$  en el caso de la mezcla física indicativo de una posible interacción de los grupos etilo. No se observó ningún cambio en el complejo preparado mediante amasado. En el caso del complejo preparado mediante disolvente común, la reducción de intensidad de los picos aromáticos en la región de 1570  $\text{cm}^{-1}$  a 1350  $\text{cm}^{-1}$  de la rifampicina indicó que se había producido una interacción. La razón pudo ser una posible restricción de grupos fenilo de rifampicina dentro de la cavidad de la HE $\beta$ -CD.

In the FTIR spectra of HE $\beta$ -CD (Fig. 6), the peak at 1436.9  $\text{cm}^{-1}$  of -C-H was shifted to 1429.2  $\text{cm}^{-1}$  in case of PM, which indicated that ethyl groups might have interacted. No changes have observed in the KN complex. In case of CS complex, reduced intensities of aromatic peaks in the region of 1570  $\text{cm}^{-1}$  to 1350  $\text{cm}^{-1}$  of rifampicin indicated interaction had taken place. The reason could be phenyl groups of rifampicin might be restricted within the HE $\beta$ -CD cavity.

**FIGURA 6.** Espectro FTIR de (A) HE $\beta$ -CD, (B) HE $\beta$ -CD-rifampicina preparada mediante mezcla física, (C) HE $\beta$ -CD-rifampicina preparada mediante amasado y (D) HE $\beta$ -CD-rifampicina preparada mediante disolvente común.

**FIGURE 6.** FTIR spectra of (A) HE $\beta$ -CD, (B) HE $\beta$ -CD-rifampicin prepared by physical mixture (C) HE $\beta$ -CD-rifampicin prepared by kneading and (D) HE $\beta$ -CD-rifampicin prepared by common solvent.





### *Análisis de calorimetría diferencial de barrido (CDB)*

En la calorimetría diferencial de barrido de la rifampicina, la aparición de dos picos de fusión a 185,020 °C y 229,110 °C con  $\Delta H=13,349$  j/g y  $\Delta H=96,326$  j/g, respectivamente, indica la presencia de dos formas polimórficas (Figura 7). Se observaron tres picos endotérmicos a 109,199 °C, 169,062 °C y 225,388 °C en la calorimetría diferencial de barrido de la  $\beta$ -CD indicativos de su naturaleza cristalina. En los complejos de  $\beta$ -CD, el pico endotérmico de  $\beta$ -CD a 109,199 °C se desplazó a 94,05 °C, 90,708 °C y 80 °C en los complejos preparados mediante mezcla física, amasado y disolvente común, respectivamente, lo que indicó una posible interacción fisicoquímica y una reconstitución de cristales. En el caso del complejo preparado mediante disolvente común, la interacción fue máxima y se produjo una verdadera formación de inclusiones. Se observó una nueva reducción en las áreas de los picos endotérmicos de la rifampicina junto con el desplazamiento del pico. Esta reducción de área indica una reducción de energía necesaria para la fusión<sup>19</sup> o la dispersión molecular de la rifampicina a través de la matriz de  $\beta$ -CD<sup>18</sup> que, a su vez, mejora la solubilidad del fármaco.

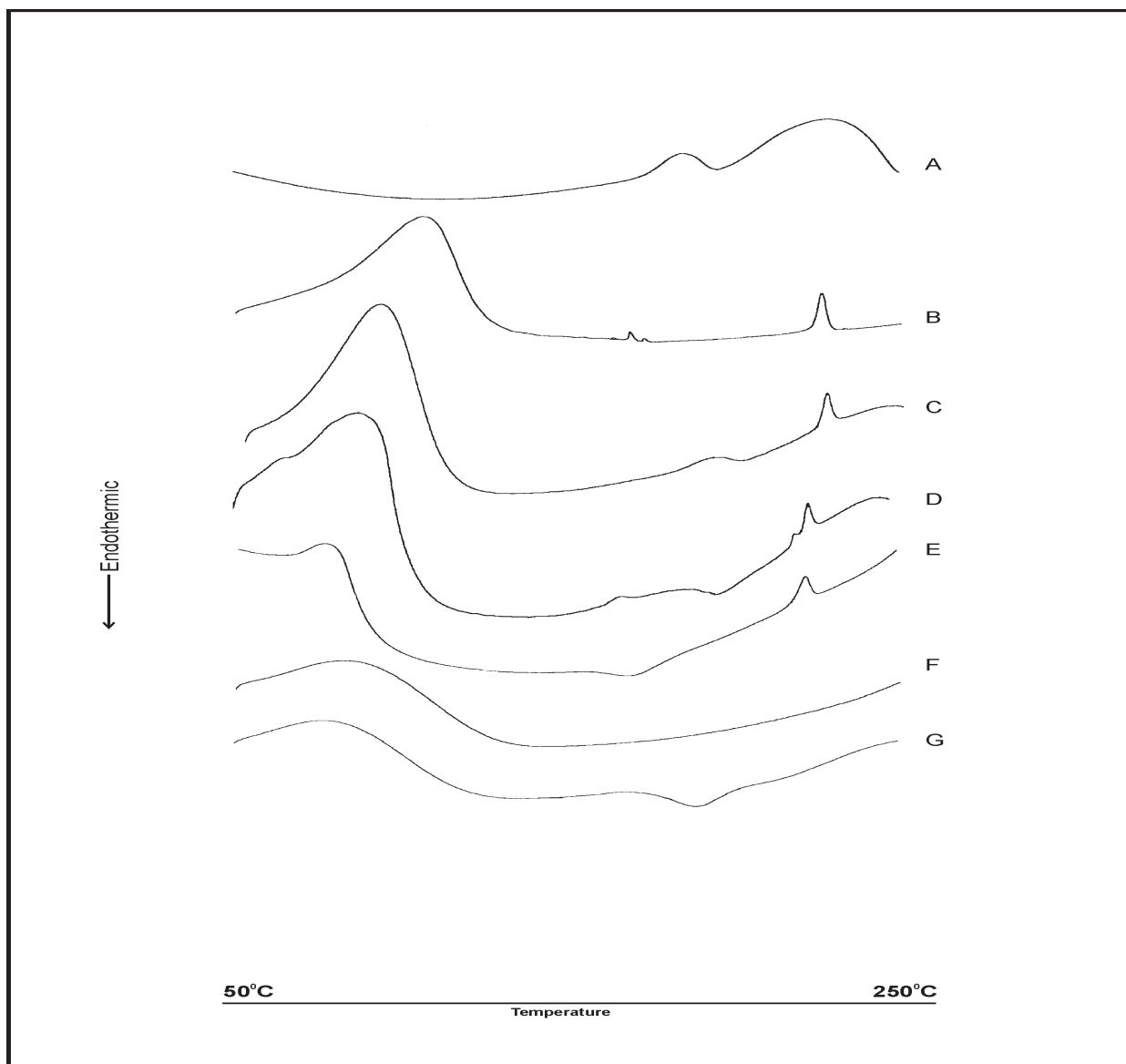
En la calorimetría diferencial de barrido de los complejos de HE $\beta$ -CD, se redujo el área del pico endotérmico de la rifampicina a 185,020 °C, y se produjo una ampliación de otro pico a 229,110 °C en todos los compuestos preparados mediante diferentes métodos. En los compuestos de fármaco y  $\beta$ -CD, los resultados muestran una menor interacción entre el fármaco y el agente aglutinante. Sin embargo, se observó la aparición de un pico exotérmico a 189,552 °C en el complejo obtenido mediante disolvente común que indicó la posibilidad de una interacción considerable.

### *DSC Analysis*

In DSC of rifampicin, the appearance of two melting peaks at 185.020° C and 229.110° C with  $\Delta H=13.349$  j/g and  $\Delta H=96.326$  j/g respectively, indicated the presence of two polymorphs. (Fig 7). Three endothermic peaks at 109.199° C, 169.062° C and 225.388° C were observed in DSC of  $\beta$ -CD, which indicate its crystalline nature. In  $\beta$ -CD complexes, the endothermic peak of  $\beta$ -CD at 109.199 ° C has shifted to 94.05 ° C, 90.708 ° C and 80 ° C in complexes prepared by the PM, KN and CS respectively indicating probability physicochemical interaction had taken place and reconstitution of crystals. The interaction in case of CS was maximum and a true inclusion formation. Further reduction in the areas of endothermic peaks of rifampicin was observed along with the shift in the peak. This reduction in area indicated that reduction in energy required for melting<sup>19</sup> or molecular dispersion of rifampicin through the matrix of  $\beta$ -CD,<sup>18</sup> which in turn enhances solubility of drug.

In DSC of HE $\beta$ -CD complexes, area of endothermic peak of rifampicin at 185.020° C was reduced, and another peak at 229.110° C was broadened in all complexes prepared by different methods. These results indicate less interaction had taken place between drug and complexing agent when compound to  $\beta$ -CD. However appearance of exothermic peak was observed at 189.552 ° C in the complex obtained by CS indicating probability considerable interaction.

**FIGURA 7.** Termograma por CDB de (A) rifampicina pura, (B)  $\beta$ -CD, (C)  $\beta$ -CD-rifampicina preparada mediante mezcla física, (D)  $\beta$ -CD-rifampicina preparada mediante amasado (D)  $\beta$ -CD-rifampicina preparada mediante disolvente común, (D) HE $\beta$ -CD y (E) HE $\beta$ -CD-rifampicina preparada mediante disolvente común.  
**FIGURE 7.** DSC thermogram of (A) pure rifampicin, (B)  $\beta$ -CD, (C)  $\beta$ -CD-rifampicin prepared by Physical mixture (D)  $\beta$ -CD-rifampicin prepared by kneading (D)  $\beta$ -CD-rifampicin prepared by common solvent, (D) HE $\beta$ -CD and (E) HE $\beta$ -CD-rifampicin prepared by common solvent.



#### Difracción de rayos-x de polvo

Se observaron 29 picos en los patrones de difracción de rayos-x de polvo de rifampicina pura (Figura 8) y 47 picos en los de  $\beta$ -CD indicativos de su naturaleza cristalina. Se ha demostrado que los picos totales de una mezcla son la suma de los picos individuales obtenidos; no existe ninguna interacción.<sup>18</sup> En consecuencia, se esperaba obtener 76 picos en la mezcla, pero se observó una disminución en el número de picos (27, 26

#### Powder x-ray Diffraction

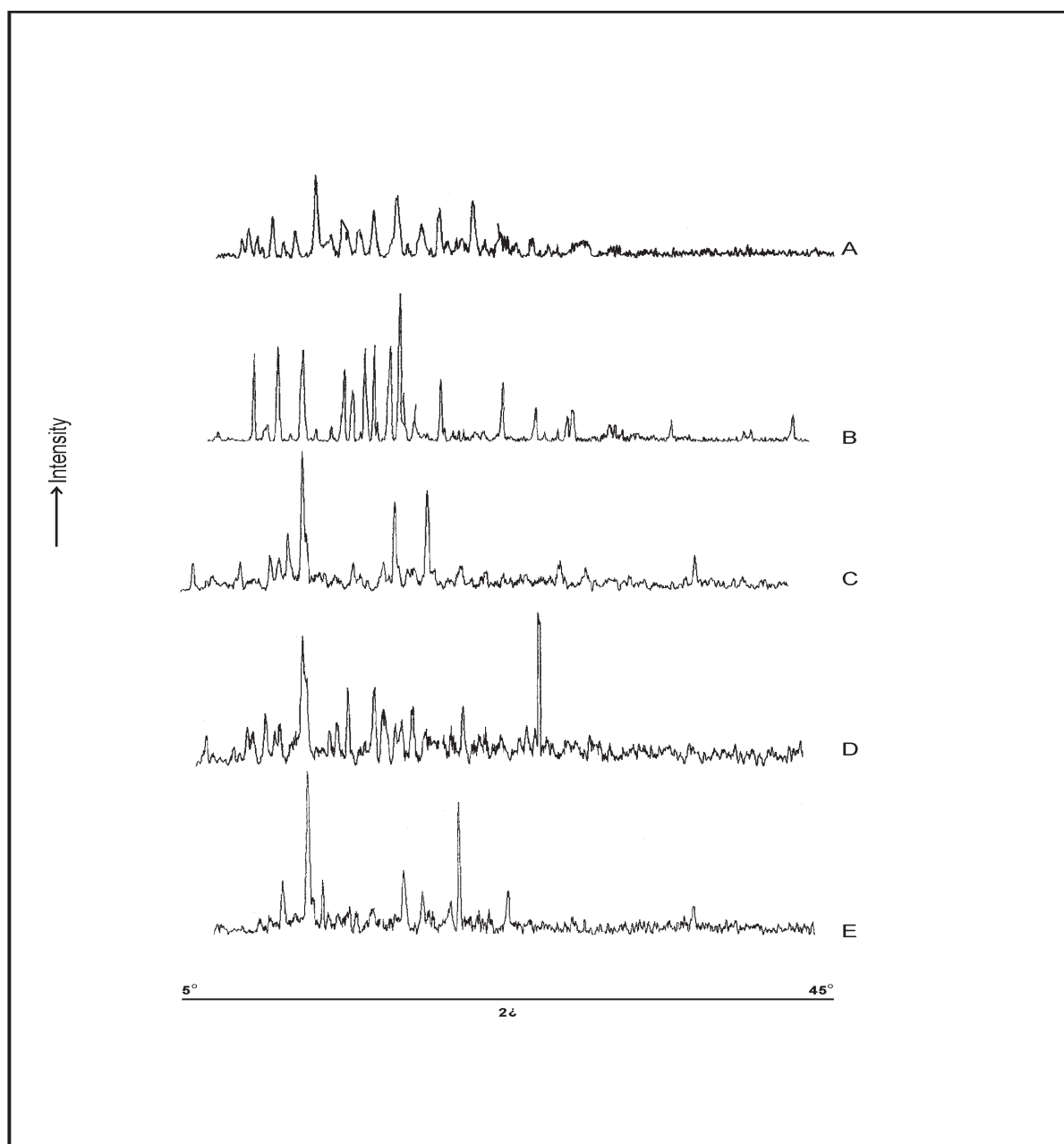
There were 29 peaks and 47 peaks in powder x-ray diffraction patterns of pure rifampicin (Fig. 8) and  $\beta$ -CD respectively that indicating their crystalline nature. It has been reported that total peaks in a mixture is sum of individual peaks provided, there is no interaction.<sup>18</sup> Accordingly 76 peaks were expected in the mixture but a decrease in the number of peaks were observed i.e. 27, 26, and 24 number of peaks in

y 24 picos en los complejos preparados mediante mezcla física, amasado y disolvente común, respectivamente) indicativa de una interacción con la ciclodextrina y de una reducción de la cristalinidad de la molécula de fármaco.

the complexes prepared by PM, KN, and CS respectively, which indicated interaction with cyclodextrin and reduced crystallinity of drug molecule.

**FIGURA 8.** Patrón de difracción de rayos-x de polvo de (A) rifampicina pura, (B)  $\beta$ -CD, (C)  $\beta$ -CD-rifampicina preparada mediante mezcla física, (D)  $\beta$ -CD-rifampicina preparada mediante amasado y (E)  $\beta$ -CD-rifampicina preparada mediante disolvente común.

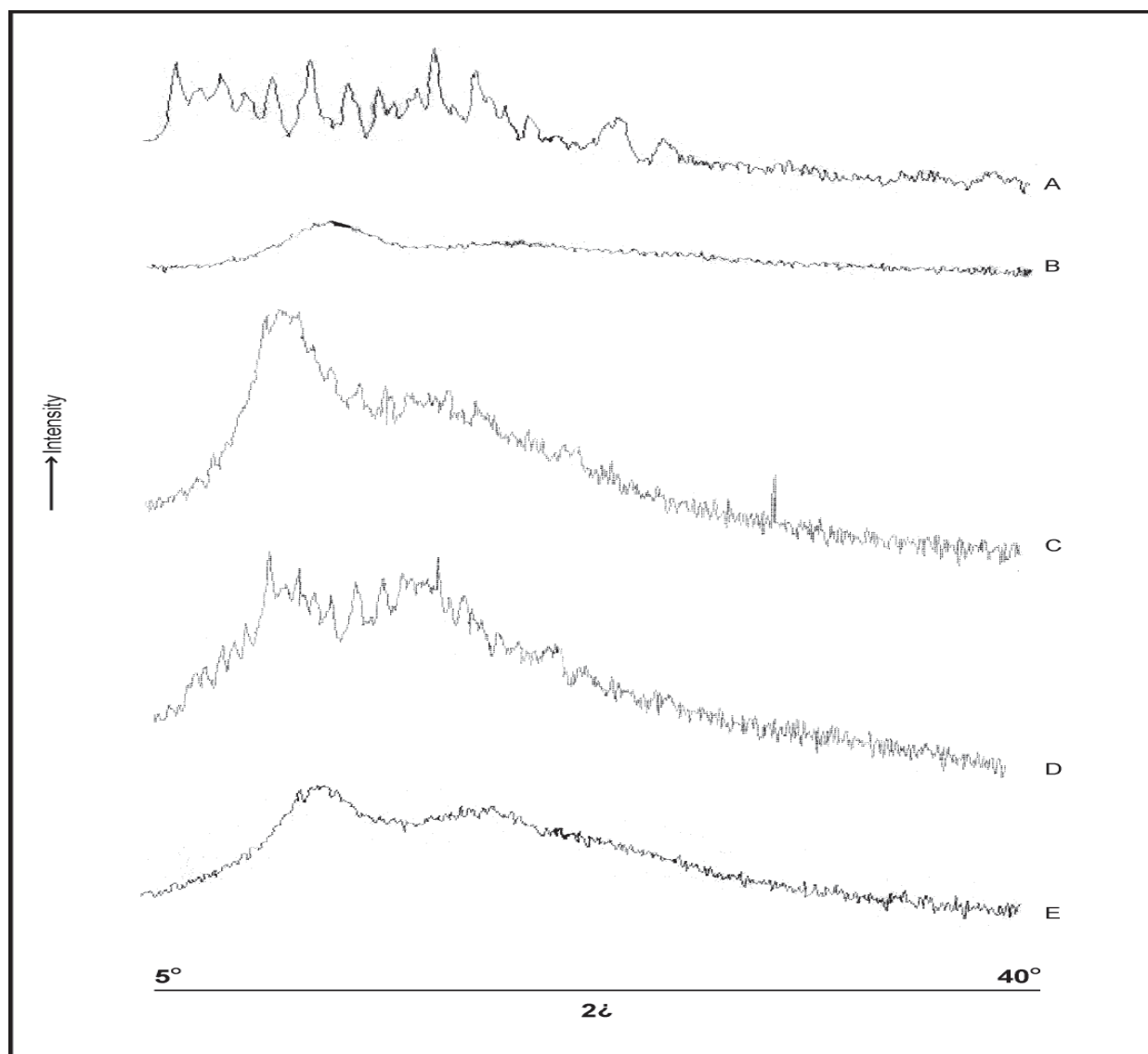
**FIGURE 8.** Powder x-ray diffraction pattern of (A) pure rifampicin, (B)  $\beta$ -CD, (C)  $\beta$ -CD-rifampicin prepared by physical mixture, (D)  $\beta$ -CD-rifampicin prepared by kneading, and (E)  $\beta$ -CD-rifampicin prepared by common solvent.



La ausencia de picos en el patrón de difracción de rayos-x de polvo de HE $\beta$ -CD pura (Figura 9) confirma su naturaleza amorfa. Los 12 picos de rifampicina pura se redujeron a 2, 9 y 1 en los complejos preparados mediante mezcla física, amasado y disolvente común, respectivamente. La disminución del grado de cristalinidad fue mayor en el complejo preparado mediante el método de disolvente común que en los otros complejos.

As there were no peaks in powder x-ray diffraction pattern of pure HE $\beta$ -CD (Fig. 9), it confirms its amorphous nature. The 12 peaks of pure rifampicin were reduced in number to 2, 9, and 1 in complexes prepared by PM, KN and CS method respectively. The degree of crystallinity was decreased more in the complex prepared by CS method than other complexes.

**FIGURA 9.** Patrón de difracción de rayos-x de polvo de (A) rifampicina pura, (B) HE $\beta$ -CD, (C) HE $\beta$ -CD-rifampicina preparada mediante mezcla física, (D) HE $\beta$ -CD-rifampicina preparada mediante amasado y (E) HE $\beta$ -CD-rifampicina preparada mediante disolvente común.  
**FIGURE 9.** Powder x-ray diffraction pattern of (A) pure rifampicin, (B) HE $\beta$ -CD, (C) HE $\beta$ -CD-rifampicin prepared by physical mixture (D) HE $\beta$ -CD-rifampicin prepared by kneading and (E) HE $\beta$ -CD-rifampicin prepared by common solvent.



### *Microscopía electrónica de barrido*

Los estudios de microscopía electrónica de barrido (Figura 10) revelan un cambio en la morfología de las partículas y la homogeneidad del producto. Aun cuando exista una clara diferencia en el estado de cristalización del fármaco puro y de los complejos, este estudio resulta inadecuado para confirmar la formación de complejos de inclusión, pero ayuda a evaluar la existencia de homogeneidad del componente simple en los preparados obtenidos.<sup>20</sup> Los estudios de microscopía electrónica de barrido (MEB) mostraron que la  $\beta$ -CD pura se presentaba en forma de pequeños fragmentos de forma irregular. A diferencia de la sustancia en polvo obtenida en la mezcla física, en los complejos preparados mediante amasado se obtuvieron microcristales de forma irregular. La etil- $\beta$ -CD mostró la forma de una partícula de forma esférica porosa claramente definida. En la mezcla física se apreciaron muy pocas partículas irregulares y de forma esférica de rifampicina. En el complejo preparado mediante amasado, no apareció ninguna partícula de forma esférica; sólo se obtuvieron partículas homogéneas de forma irregular. Sin embargo, en el complejo preparado mediante disolvente común se obtuvieron partículas aplanadas de forma irregular diferentes a la rifampicina pura y a la etil- $\beta$ -CD pura. Se produjo, por tanto, una modificación de la morfología de la  $\beta$ -CD pura en los complejos, que aparecen como componentes simples.

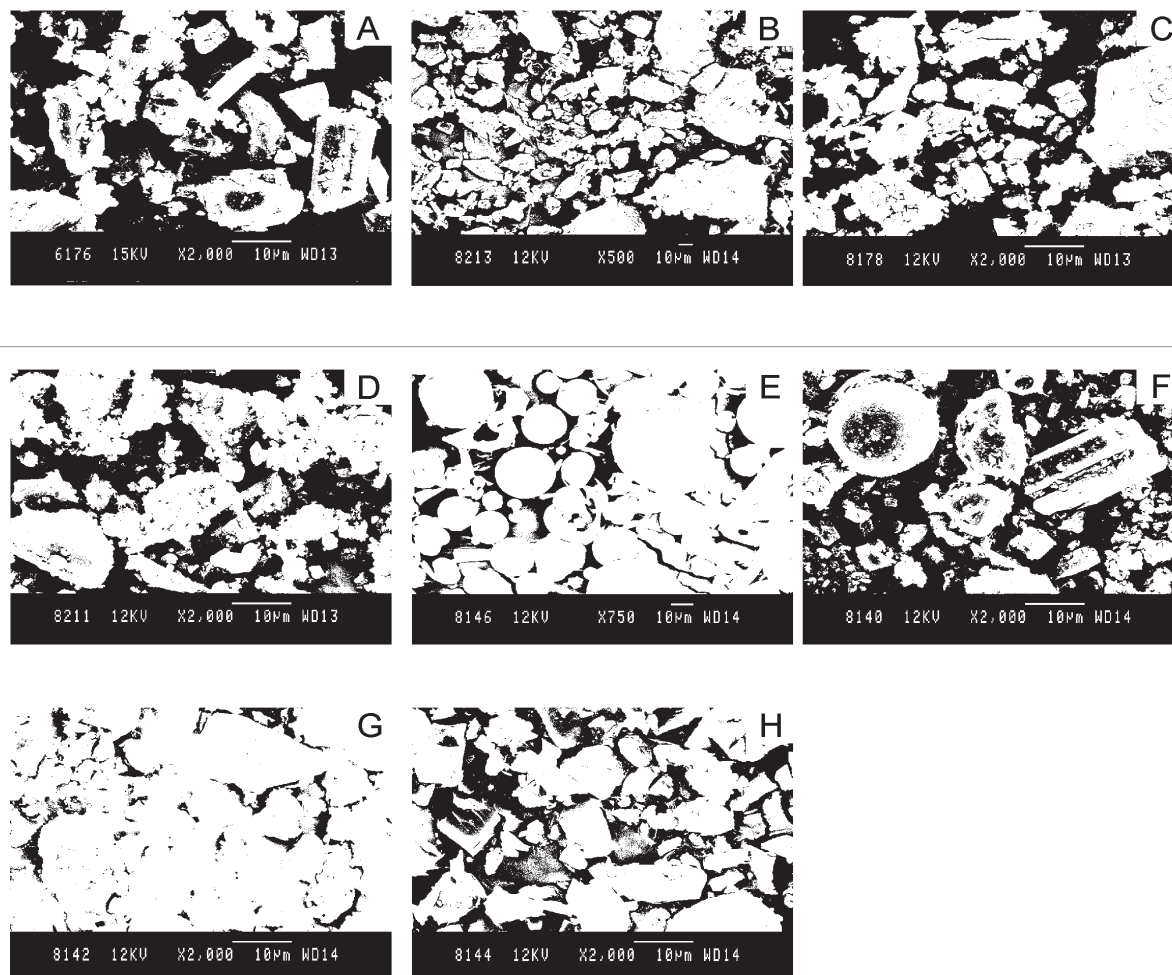
### *Scanning Electron Microscopy*

SEM studies (Fig. 10) reveal change in the morphology of particles and homogeneity of the product. Even if there is a clear difference in crystallization state of the pure and the complexes, this study is inadequate to confirm inclusion complexation, but helps to assess the existence of homogeneity of single component in the preparations obtained.<sup>20</sup> Scanning Electron Microscopy studies (SEM) observed that pure  $\beta$ -CD is in the form of irregular shaped flakes. Physical mixture was shown to be powdered substance but the complexes prepared kneading has shown irregular shaped micro crystals. Ethyl  $\beta$ -CD has shown the clear-cut spherical shaped particle with pores. Very few spherical shaped and irregular shaped particles of rifampicin are shown in physical mixture. In kneading complex there are no spherical shaped appeared and only homogenous irregular shaped particles have shown. However common solvent has shown flattened irregular shaped particles, which were different from the pure rifampicin and pure HE $\beta$ -CD. The morphology of pure  $\beta$ -CD thus has changed in complexes with the complexes appearing as single component.



**FIGURA 10.** Microscopía electrónica de barrido de (A) rifampicina pura, (B)  $\beta$ -CD, (C)  $\beta$ -CD-rifampicina preparada mediante mezcla física, (D)  $\beta$ -CD-rifampicina preparada mediante amasado, (E) HE $\beta$ -CD (F) HE $\beta$ -CD-rifampicina preparada mediante mezcla física, (G) HE $\beta$ -CD-rifampicina preparada mediante amasado y (H) HE $\beta$ -CD-rifampicina preparada mediante disolvente común.

**FIGURE 10.** Scanning Electron Microscopy of (A) pure rifampicin, (B)  $\beta$ -CD (C)  $\beta$ -CD-rifampicin prepared by physical mixture, (D)  $\beta$ -CD-rifampicin prepared by kneading, (E) HE $\beta$ -CD (F) HE $\beta$ -CD-rifampicin prepared by physical mixture, (G) HE $\beta$ -CD-rifampicin prepared by kneading, and (H) HE $\beta$ -CD-rifampicin prepared by common solvent.



### Susceptibilidad del fármaco

Se realizaron estudios de susceptibilidad del fármaco utilizando una cepa natural número 10934 y se obtuvo una concentración inhibitoria mínima (CIM) de rifampicina de 64  $\mu$ g/ml. En nuestros estudios preliminares, se observó una reducción de CIM de 64  $\mu$ g/ml a 32  $\mu$ g/ml en todos los complejos de rifampicina en esta cepa natural (Tabla 2). El aumento de la actividad antituberculosa in vitro de la rifampicina se puede atribuir a una mejor permeación del fármaco a través de la pared celular del bacilo de la tuberculosis a causa de la ciclodextrina.<sup>21</sup> Grancher<sup>22</sup> también

### Drug Susceptibility

Using wild strain No. 10934, drug susceptibility studies were carried out and MIC of pure rifampicin was found to be 64  $\mu$ g/ml. In our preliminary studies, a reduction in MIC from 64  $\mu$ g/ml to 32  $\mu$ g/ml was observed in all the complexes of rifampicin on this wild strain (Table 2). Increased in vitro anti-tubercular activity of rifampicin might be attributed to enhancement permeation of drug through the cell wall of bacilli of tuberculosis due to CD.<sup>21</sup> Similarly, improved in vitro activity are observed by Grancher<sup>22</sup> in case of anti-viral activity of ribovarin against

observó una mejora de la actividad in vitro en el caso de la actividad antiviral de la ribavarina empleada en el tratamiento del virus del sarampión y una mejora de la actividad micótica del sertaconazol.<sup>23</sup>

measle virus and improved mycotic activity of serataconazole.<sup>23</sup>

**TABLA 2.** Actividades antituberculosas de la rifampicina y sus complejos de ciclodextrina.

**TABLE 2.** Anti-tubercular activities of rifampicin and its cyclodextrin complexes.

Cepa 10934

Strain 10934

Agente aglutinante <i>Complexing agent</i>	Método de preparación <i>Preparation method</i>	Conc. de fármaco Drug conc.	Conc. de fármaco Drug conc.	Conc. de fármaco Drug conc.
		16 $\mu\text{g/ml}$	32 $\mu\text{g/ml}$	64 $\mu\text{g/ml}$
Rifampicina pura <i>Pure rifampicin</i>	-	1+	25 c	NC
$\beta$ -CD	AM KN	NC NG	NC NG	NC NG
	DC CS	15 c	5 c	NC NG
HE $\beta$ -CD	AM KN	NC NG	NC NG	NC NG
	DC CS	1 c	NC NG	NC NG

Controles: LJ plano - 3+  
LJ plano con ciclodextrina (sin fármaco) - 3+  
Nota: 1+ = >100 colonias y <200  
3+ = >300 colonias  
2+ = >200 colonias y <300  
NC = Ningún crecimiento  
CD = ciclodextrina  
C = colonias

Controls: Plain LJ - 3+  
Plain LJ with cyclodextrin (without drug) - 3+  
Note: 1+ = >100 colonies and <200  
3+ = >300 colonies  
2+ = >200 colonies and < 300  
NG = No growth  
CD = cyclodextrin  
C = colonies

### Estudios de estabilidad

Se observó una degradación de la rifampicina tras la cinética de primer orden. Se determinó la degradación de primer orden del fármaco puro y los complejos (Tabla 3). La protección máxima se observó en el caso del complejo preparado mediante el método de disolvente común. Los productos degradados se separaron mediante el método HPLC y sólo se estimó la rifampicina. La constante de degradación de primer orden se redujo de  $-8,9534 \pm 0,280 \times 10^{-5} \text{ día}^{-1}$  a  $-5,952 \pm 0,158 \times 10^{-1} \text{ día}^{-1}$  en el caso del complejo preparado mediante mezcla física, que es el complejo más reducido. Se observó una reducción de la constante de degradación de todos los complejos estadísticamente significativa (prueba t,  $p < 0,05$ )<sup>24</sup>.

### Stability Studies

It was found that degradation of rifampicin followed first order kinetics. The first order degradation of pure drug and complexes were determined (Table 3). The maximum protection was observed in case of complex prepared by common solvent method. The degraded products were separated by HPLC method and only rifampicin was estimated. The first order degradation constant has been reduced from  $-8.9534 \pm 0.280 \times 10^{-5} \text{ day}^{-1}$  to  $-5.952 \pm 0.158 \times 10^{-1} \text{ day}^{-1}$  in case of complex prepared by PM, which is lowest among the complexes. The reduction in degradation constant of all the complexes was found to be statistically significant (t-test,  $p < 0.05$ ).<sup>24</sup>

**TABLA 3.** Estudios de estabilidad térmica .  
**TABLE 3.** Thermal stability studies of rifampicin and its cyclodextrin complexes.

Nº de muestra <i>S.No</i>	Agente aglutinante <i>Complexing Agent</i>	Método de preparación <i>Method Preparation</i>	Constante de degradación <i>Degradation Constant</i> -k x 10 <sup>-5</sup>
1	Fármaco puro <i>Pure drug</i>		8.953 $\pm$ 0.280
2	$\beta$ -CD	MF	5.952 $\pm$ 0.158
3		PM	
4		AM	723 $\pm$ 0.092
5		KN	
6	HE- $\beta$ -CD	DC	6.809 $\pm$ 0.158
7		CS	
		MF	7.472 $\pm$ 0.131
		PM	
		AM	7.472 $\pm$ 0.131
		KN	
		DC	7.694 $\pm$ 0.180
		CS	

Cada valor representa la media  $\pm$  la desviación estándar de n=3

$\beta$ -CD =  $\beta$ -ciclodextrina,  $\beta$ -CD,  $\beta$ -ciclodextrina, HE $\beta$ -CD, Hidroxietil- $\beta$ -ciclodextrina, -k= constante de velocidad de primer orden.

Each value is mean  $\pm$  standard deviation of n=3

$\beta$ -CD =  $\beta$ -cyclodextrin,  $\beta$ -CD,  $\beta$ -cyclodextrin, HE $\beta$ -CD, Hydroxy ethyl  $\beta$ -cyclodextrin, -k= first order rate constant.

### Conclusiones

Por tanto, se puede concluir que el complejo de ciclodextrina de rifampicina se pudo preparar correctamente mediante los métodos de disolvente común y amasado. La formación de complejos con ciclodextrinas en  $\beta$ -CD específicas mostró una mejor solubilidad, estabilidad y actividad antituberculosa in vitro en comparación con el fármaco puro. Sin embargo, los derivados hidroxilados de la  $\beta$ -CD, tales como la HE $\beta$ -CD, no mostraron una mejor solubilidad, aunque sí una mejor estabilidad y actividad antituberculosa in vitro. El análisis de los complejos mediante los métodos de difracción de rayos-x, microscopía electrónica de barrido (MEB), calorimetría diferencial de barrido (CDB) y espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) mostró una considerable interacción de las moléculas de ciclodextrina con la molécula de rifampicina, que aumentó considerablemente la solubilidad y la estabilidad de la molécula de fármaco. La actividad in vitro de los complejos de fármaco mejoró en todos los complejos de ciclodextrina. Por tanto, podemos concluir que la

### Conclusions

Thus it can be concluded that CD complex of rifampicin could be successfully prepared by the kneading and common solvent methods. Complexation with cyclodextrins in particular  $\beta$ -CD showed improved solubility, stability and in vitro anti-tubercular activity when compared to the pure drug. However, the hydroxylated derivatives of  $\beta$ -CD like HE $\beta$ -CD did not improve solubility, however the stability and in vitro anti-tubercular activity were improved. Analysis of the complexes by FTIR, DSC, SEM, and X-ray diffraction methods showed considerable interaction of CD molecules with rifampicin molecule, which has increased the solubility and stability of the drug molecule considerably. In vitro activity of the drug complexes has improved in all the cyclodextrin complexes. Thus we can conclude that complexation of rifampicin by way of cyclodextrin does enhance its solubility, stability and in vitro activity.

formación de complejos de rifampicina mediante ciclodextrina mejora su solubilidad, estabilidad y actividad in vitro.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores manifiestan su agradecimiento al profesor Shivananda, rector del Al-Ameen College of Pharmacy de Bangalore, y al profesor Amit Kumar Das, rector y director del Krupanidhi College of Pharmacy de Bangalore, por facilitar las instalaciones necesarias para el desarrollo de este trabajo de investigación. También deseamos manifestar nuestro agradecimiento al profesor Sadashivam, del Raman Research Institute de Bangalore, al Dr. Prahlad Kumar, del NTI de Bangalore, y a los profesores Krishna y T.N. Guru Row, del SIF (Indian Institute of Science) de Bangalore, por su generosa colaboración.

### ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank Prof. Shivananda, Principal, Al-Ameen College of Pharmacy, Bangalore and Prof. Amit Kumar Das, Principal and Management of Krupanidhi College of Pharmacy, Bangalore for providing the facilities to carry out the research work. We wish to extend our thanks to Prof. Sadashivam, Raman Research Institute, Bangalore, Dr. Prahlad Kumar, NTI, Bangalore and Prof. Krishna and Prof. T.N. Guru Row, SIF, I.I.Sc., Bangalore for their generous help.

### BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Loftsson T, Brewster ME. Cyclodextrin as pharmaceutical excipients. *Pharma Manager*. 1997; 22-32
2. Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrin. I. Drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Science*. 1996; 85: 1024-1074
3. Jarho P, Urtti A, Jarvinen K, Pate DW, Jarvinen T. Hydroxy propyl-beta-cyclodextrin increases aqueous solubility and stability of anandamide. *Life Sci*. 1996; 58: 181-185
4. Jarho P, Urtti A, Jarvinen T. Hydroxy propyl-beta-cyclodextrin increases aqueous solubility and stability of pilocarpin produgs. *Pharm. Res*. 1995; 12: 1371-1375
5. Sanghavi NM, Venkatesh H, Tandel V. Solubilization of glibenclamide with beta-cyclodextrin and its derivatives. *Drug. Dev. Ind. Pharm*. 1994; 20: 1275-1283
6. Martin A. In: *Physical pharmacy*, 4<sup>th</sup> edn. New Delhi: B.I. Waverly Pvt Ltd, 1995; pp. 259- 260.
7. *British Pharmacopoeia* London: Her Majesty's Stationary Office, Vol. I pp 1988, 493-494
8. Hartmann G, Honikel KO, Knussel F, Nuesch. *Biochim. Biophys. Acta*, 145, 1967; 145, 843.
9. Reynolds JEF. *Martindale The Extra Pharmacopoeia*, 31<sup>st</sup> edn. London: Royal Pharmaceutical Society, 1996; pp. 129-297
10. Lemke TL. Antimycobacterial Agents. In: Foye, W.O., Lemke, T.L., Williams DA. *Principles of medicinal chemistry*, 4<sup>th</sup> edn, New Delhi: B. I. Waverly Pvt Ltd, 1995; pp. 747-758
11. Rawlins EA. In: *Bentley's Text Book of Pharmaceutics*, 8<sup>th</sup> edn. London: Bailliere Tindall, 1992; pp. 594-611
12. Higuchi T, Connors KA. In: *Advances in analytical chemistry instrumentation*, vol IV. New York: Wiley-Interscience, 1965; pp. 117
13. Tenjarla S, Puranajoti P, Kasina R, Mandal T. Preparation, characterization, and evaluation of miconazole-cyclodextrin complexes for improved and topical delivery. *J. Pharm. Sciences*. 1998; 87: 425-429
14. Veiga MD, Diaz PJ, Ahasan F. Interaction of Griseofulvin with cyclodextrin in solid binary systems. *J. Pharm. Sciences*. 1998; 87: 891-900.
15. Rawlins EA. In: *Bentley's Text Book of Pharmaceutics*, 8<sup>th</sup> edn. London: Bailliere Tindall, 1992; pp. 3-18
16. Yateen Shah. S. Khanna KC, Jindal, VS Dighe. *Drug Dev. Ind. Pharmacy*, 18 (14), 1589-1596, 1992 and *J. Pharm. Biomed. Analysis* 12(4), 493-497, 1996.
17. Collins CH, Patricia M L, Grange JM. In: *Microbiological Methods*, 7<sup>th</sup> edn. Oxford OX 28DP: Butterworth Heinemann Ltd, 1995; pp. 410-413
18. Aithal KS, Udapa N, Sreenivasan KK. Physicochemical properties of drug-cyclodextrin complexes. *Indian Drugs*. 1995; 32: 293-305
19. Eugene F, Timothy AH. *Preformulation*. In: Lachman, L., Liberman, H. A., Kanig, J.L. *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*, 3<sup>rd</sup> edn. Bombay: Varghese Publishing House, 1987; 171-196
20. Buchi N. Nalluri, KPR Chowdary, KVR Murthy, AR Hayman, G Becket. Physicochemical Characterization and Dissolution Properties of Nimesulide-Cyclodextrin Binary Systems *AAPS Pharm SciTech* 2003; 4 (1) Article.

21. Masson M, Loftsson T, Masson G. Cyclodextrins as permeation enhancers: some theoretical evaluations and in vitro testing. *J. Controlled Release*. 1999; 59: 107-118
22. Grancher N, Venard V, Kedzierevitz F, Ammerlaan W, Finance C, Muller CP, et al Improved antiviral activity in vitro of ribovarin against measles virus after complexation with cyclodextrins. *Antiviral Res*. 2004; Jun; 62 (3): 135-7
23. Perdomo-Lopez, Rodriguez-Perez, A.I. Yzquierdo-Peiro J.M. White, A., Estrada, E.G., Villa, T.G., Torres-Labandeira, J.J., Effect of Cyclodextrins on the Solubility and Antimycotic Activity of Sertaconazole: Experimental and Computational Studies. *J. Pharm. Sci.* Vol. 91 No. 11. November 2002, 2408-2415.
24. Rao BP, Suresh S, Preparation and Evaluation of  $\gamma$ -cyclodextrin Complexes of Rifampicin, *Indian Drugs* 41 (11) November 2004, 650-654.